

| | | | | |
|--|---|---|--|---|
| (51) 国際特許分類6 C12P 21/08, G01N 33/53, C07K 16/24 | A1 | (11) 国際公開番号 WO99/15691 (43) 国際公開日 1999年4月1日(01.04.99) | | |
| <table border="0"> <tr> <td data-bbox="110 331 799 1075" style="vertical-align: top;"> (21) 国際出願番号 PCT/JP98/03421 (22) 国際出願日 1998年7月31日(31.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/276475 1997年9月24日(24.09.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 矢野和樹(YANO, Kazuki)(JP/JP) 〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ3-1 Tochigi, (JP) 小林文枝(KOBAYASHI, Fumie)(JP/JP) 〒329-1104 栃木県河内郡河内町下岡本3777-4 Tochigi, (JP) 後藤雅昭(GOTO, Masaaki)(JP/JP) 〒329-0502 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1 Tochigi, (JP) </td> <td data-bbox="799 331 1490 1075" style="vertical-align: top;"> 驚田尚洋(WASHIDA, Naohiro)(JP/JP) 〒329-0518 栃木県下都賀郡石橋町花の木3-4-12 Tochigi, (JP) 津田英資(TSUDA, Eisuke)(JP/JP) 〒329-0434 栃木県河内郡南河内町 園2-13-1 ダイアパレス自治医大5番館407 Tochigi, (JP) 東尾侃二(HIGASHIO, Kanji)(JP/JP) 〒350-0822 埼玉県川越市山田1769-10 Saitama, (JP) 山田芳司(YAMADA, Yoshiji)(JP/JP) 〒458-0013 愛知県名古屋市長区ほら貝2丁目82の3 グローリアス緑区ほら貝702号 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 </td> </tr> </table> | | | (21) 国際出願番号 PCT/JP98/03421 (22) 国際出願日 1998年7月31日(31.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/276475 1997年9月24日(24.09.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 矢野和樹(YANO, Kazuki)(JP/JP) 〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ3-1 Tochigi, (JP) 小林文枝(KOBAYASHI, Fumie)(JP/JP) 〒329-1104 栃木県河内郡河内町下岡本3777-4 Tochigi, (JP) 後藤雅昭(GOTO, Masaaki)(JP/JP) 〒329-0502 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1 Tochigi, (JP) | 驚田尚洋(WASHIDA, Naohiro)(JP/JP) 〒329-0518 栃木県下都賀郡石橋町花の木3-4-12 Tochigi, (JP) 津田英資(TSUDA, Eisuke)(JP/JP) 〒329-0434 栃木県河内郡南河内町 園2-13-1 ダイアパレス自治医大5番館407 Tochigi, (JP) 東尾侃二(HIGASHIO, Kanji)(JP/JP) 〒350-0822 埼玉県川越市山田1769-10 Saitama, (JP) 山田芳司(YAMADA, Yoshiji)(JP/JP) 〒458-0013 愛知県名古屋市長区ほら貝2丁目82の3 グローリアス緑区ほら貝702号 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP98/03421 (22) 国際出願日 1998年7月31日(31.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/276475 1997年9月24日(24.09.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 矢野和樹(YANO, Kazuki)(JP/JP) 〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ3-1 Tochigi, (JP) 小林文枝(KOBAYASHI, Fumie)(JP/JP) 〒329-1104 栃木県河内郡河内町下岡本3777-4 Tochigi, (JP) 後藤雅昭(GOTO, Masaaki)(JP/JP) 〒329-0502 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1 Tochigi, (JP) | 驚田尚洋(WASHIDA, Naohiro)(JP/JP) 〒329-0518 栃木県下都賀郡石橋町花の木3-4-12 Tochigi, (JP) 津田英資(TSUDA, Eisuke)(JP/JP) 〒329-0434 栃木県河内郡南河内町 園2-13-1 ダイアパレス自治医大5番館407 Tochigi, (JP) 東尾侃二(HIGASHIO, Kanji)(JP/JP) 〒350-0822 埼玉県川越市山田1769-10 Saitama, (JP) 山田芳司(YAMADA, Yoshiji)(JP/JP) 〒458-0013 愛知県名古屋市長区ほら貝2丁目82の3 グローリアス緑区ほら貝702号 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 | | | |
| (54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING BONE DYSBOLISM (54) 発明の名称 骨代謝異常症の診断方法 (57) Abstract A method for diagnosing bone dysbolism, in particular osteoporosis and joint diseases characterized by measuring the concentration of osteoclastogenesis inhibitory factors (OCIFs) in the bodily fluid; a monoclonal antibody equally recognizing monomeric and dimeric OCIFs; a monoclonal antibody selectively recognizing the dimeric OCIF alone; and OCIF assay kits which contain the monoclonal antibodies of the above two types, recognizing different epitopes of OCIFs, and having a high affinity and a dissociation constant with an antigen of 2×10^{-7} M or below. The above antibodies and kits are useful in diagnosing bone dysbolism, in particular, osteoporosis and joint diseases or analytical reagents for laboratory use, etc. | | | | |

骨代謝異常症の診断方法の提供。

体液中の破骨細胞形成抑制因子(OCIF)濃度を測定することを特徴とする骨代謝異常症、特に骨粗鬆症及び関節疾患の診断方法。モノマー型及びダイマー型OCIFを等しく認識するモノクローナル抗体。ダイマー型OCIFのみを選択的に認識するモノクローナル抗体。及びOCIFの異なるエピトープを認識し、抗原との解離定数が $2 \times 10^{-7} \text{M}$ 以下の高親和性を有する前記2種のモノクローナル抗体を構成に含むOCIF測定用キットの提供。

骨代謝異常症、特に骨粗鬆症及び関節疾患の診断方法、あるいは研究用分析試薬などに有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパムフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | |
|-----------------|------------|-------------------|---------------|
| AE アラブ首長国連邦 | ES スペイン | LI リヒテンシュタイン | SG シンガポール |
| AL アルバニア | FI フィンランド | LK スリ・ランカ | SI スロヴェニア |
| AM アルメニア | FR フランス | LR リベリア | SK スロヴァキア |
| AT オーストリア | GA ガボン | LS レソト | SL シェラ・レオネ |
| AU オーストラリア | GB 英国 | LT リトアニア | SN セネガル |
| AZ アゼルバイジャン | GD グレナダ | LU ルクセンブルグ | SZ スワジランド |
| BA ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE グルジア | LV ラトヴィア | TD チャード |
| BB バルバドス | GH ガーナ | MC モナコ | TG トーゴ |
| BE ベルギー | GM ガンビア | MD モルドヴァ | TJ タジキスタン |
| BF ブルキナ・ファソ | GN ギニア | MG マダガスカル | TM トルクメニスタン |
| BG ブルガリア | GW ギニア・ビサウ | MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR トルコ |
| BJ ベナン | GR ギリシャ | 共和国 | TT トリニダード・トバゴ |
| BR ブラジル | HR クロアチア | マリ | UA ウクライナ |
| BY ベラルーシ | HU ハンガリー | ML モンゴル | UG ウガンダ |
| CA カナダ | ID インドネシア | MN モーリタニア | US 米国 |
| CF 中央アフリカ | IE アイルランド | MW マラウイ | UZ ウズベキスタン |
| CG コンゴ | IL イスラエル | MX メキシコ | VN ヴィエトナム |
| CH スイス | IN インド | NE ニジェール | YU ユーゴスラビア |
| CI コートジボアール | IS アイスランド | NL オランダ | ZA 南アフリカ共和国 |
| CM カメルーン | IT イタリア | NO ノルウェー | ZW ジンバブエ |
| CN 中国 | JP 日本 | NZ ニュー・ジールランド | |
| CU キューバ | KE ケニア | PL ポーランド | |
| CY キプロス | KG キルギスタン | PT ポルトガル | |
| CZ チェコ | KP 北朝鮮 | RO ルーマニア | |
| DE ドイツ | KR 韓国 | RU ロシア | |
| DK デンマーク | KZ カザフスタン | SD スーダン | |
| EE エストニア | LC セントルシア | SE スウェーデン | |

明 細 書

骨代謝異常症の診断方法

技術分野

本発明は、骨代謝異常症、特に骨粗鬆症及び関節疾患の診断方法に関する。

また、本発明はこの診断に用いるモノクローナル抗体、及びこの抗体を用いた診断用キットに関する。

本発明は骨代謝異常症、特に骨粗鬆症及び関節疾患の診断方法、あるいは研究用分析試薬などに有用である。

背景技術

骨代謝は、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞の、総合された活性に依存している。健常成人では骨吸収と骨形成の均衡が保たれ、骨量は一定に維持される。骨代謝異常は、この均衡が崩れることにより発生すると考えられている。骨代謝異常症として、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ペーজেット病、腎性骨異栄養症、慢性関節リウマチ及び変形性関節症等が知られている。これらの骨代謝異常症の代表として骨粗鬆症が挙げられる。骨粗鬆症は骨量の減少とそれが原因となって起こる骨折や腰背痛等の臨床症状を呈する病態と考えられている。骨量減少は、成長期以降の加齢や癌の骨転移及び甲状腺機能亢進等の疾病に伴って生じるなど、その原因は様々である。現在行われている骨粗鬆症の診断方法としては、骨のX線撮影（MD法）、DPA（Dual photon absorptiometry）、DEXA（Dual Energy X-ray Absorptiometry）、CXD（Computed X-ray Densitometry）及び低周波超音波等による物理学的骨量測定装置による、骨

塩量、骨密度等の測定がある。現在これらの診断方法を用いた骨粗鬆症の診断基準は、技術革新に伴い常に改定が進められている。

確かに骨塩量、骨密度の低下は将来の骨折の危険性を予測させる。しかしながら、骨塩量、骨密度の低下が起こり得る全ての骨折の危険因子ではなく、多くは加齢に伴う現象、例えばコラーゲン線維の弾性低下、骨構造の質的劣化、筋力低下等によっても骨折の危険性は増大すると考えられている。現時点では筋力低下以外のこれらの因子を非侵襲的に計測できず、将来解決すべき重要な課題となっている。さらに骨塩量、骨密度の低下は骨代謝の破綻の結果を観察しているに過ぎず、その原因又は今後の病態の動向を示すものではないと言われている。このような骨密度測定の欠点を補うものとして、骨代謝調節因子（副甲状腺ホルモン（PTH）、活性型ビタミンD₃、及びカルシトニンなど）、又骨代謝回転に伴って骨組織から遊離してくる種々の因子（骨型アルカリフォスファターゼ、酸性フォスファターゼ、ピリジノリン、デオキシピリジノリン、タイプ1プロコラーゲンペプチド、オステオカルシンなど）の血中濃度あるいは尿中排泄量を測定することで病態を把握しようとする試みがなされている。これらの因子は測定時点での骨代謝動態を示すものであり、骨量減少の有無及びその程度を早期から予測できると期待されている。しかしこのような骨代謝マーカーにも、局所的な骨代謝の変動を表さなかったり、食事等の影響や日内変動が大きかったり、上記諸因子が必ずしも骨代謝を反映して特異的に動いている訳ではないこと等の種々の問題が残されている。このような現状から、これらの問題の解決に止まらず、鋭敏かつ特異性の高い新しい骨代謝マーカーとその測定法の開発が骨粗鬆症を始めとする様々な骨代謝疾患の的確な診断法や予防・治療法の確立のために求められている。

本発明者らは、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90（ATCC CCL186）の培養液中に破骨細胞形成抑制因子（osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF）が存在する

ことを発見し、その単離に成功した。更に、この蛋白質をコードするcDNAのクローニングにも成功し、遺伝子組み換えOCIF(rOCIF)を用いたin vitro及びin vivo 薬効評価を通して、骨代謝改善薬としてその有用性を確認した(WO 96/262 17号公報)。引き続き、本発明者らは、rOCIFの投与は各種の骨代謝異常疾患動物において、骨密度及び骨強度を顕著に改善すること、又、正常動物へのrOCIFの大量投与においても、用量依存的に骨密度及び強度を顕著に増強し、骨組織以外の各種臓器、血液生化学検査、血球系細胞のいずれにおいても全く副作用を発現しないことを確認した。これらのin vivo試験を通して、OCIFは骨組織にのみ作用する極めて組織特異性の高いサイトカインであることが判明した。更に、本発明者らは、動物細胞においてOCIFは分子量約120 kDa のホモダイマー型OCIFとして分泌生産され、プロテアーゼ等のプロセッシングを受けて分子量約 60kDaのモノマー型OCIFになることを確認した。さらに、ヒト細胞培養液にはこの両タイプのOCIFの存在が確認されているように(Tsuda et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 234, 137-142 (1997))、ヒトを含む哺乳動物体液などには、この両タイプのOCIFの存在が予想される。従って、OCIFが新しい骨代謝マーカーとなりうるかどうかを明らかにするためには、各種骨代謝異常疾患患者の体液中のそれぞれのタイプのOCIFの濃度あるいは両タイプの総濃度と各疾患の関係を精査することが必要である。そのためには、両タイプのOCIFを等しく認識できる抗体ならびにホモダイマーだけを特異的に認識する抗体が必要である。しかしながら、これまでこのような特徴を有する抗OCIFモノクローナル抗体は得られていない。

発明の開示

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意探索の結果、OCIFに極めて高い

親和性（解離定数が 10^{-9} M 以下）を有し、モノマー及びホモダイマー型OCIFを等しく認識するモノクローナル抗体、及びホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識するモノクローナル抗体を見出した。さらに、これらの抗体を用いて高感度の酵素免疫測定キット（サンドイッチELISA）を構築した。このサンドイッチELISAを用いて若年成人や高齢者の血清、及び骨粗鬆症、甲状腺機能亢進症、癌を含む各種疾患患者の血清中のOCIF濃度を測定した結果、血清OCIF濃度と骨密度の間に高い逆相関が見出された。また慢性関節リウマチ、変形性関節症、外傷、痛風発作といった各種関節疾患患者の関節液中のOCIF濃度を測定した結果、関節破壊のより進んだ患者の関節液中のOCIF濃度が低いことが見出された。以上の結果より、このサンドイッチELISAは血清OCIF濃度を測定することにより骨密度の動態を、また関節液中のOCIF濃度を測定することにより関節破壊の進行を、それぞれの確に把握でき、OCIFは骨量の減少と関節破壊を早期に予測できる新しい骨代謝異常症診断マーカーとして有用であることを見出した。従って本発明は、ヒト破骨細胞形成抑制因子（OCIF）濃度を測定することを特徴とする骨代謝異常症、特に骨粗鬆症及びリウマチ等による関節破壊の診断方法、これに用いるモノクローナル抗体、及び抗体を用いたOCIF測定用キットを提供することを課題とする。

本発明は、採取した体液中の破骨細胞形成抑制因子（OCIF）の濃度を測定し、その濃度によって骨代謝異常を診断することによりなる骨代謝異常症の診断方法に関する。

本発明の診断は、特に骨粗鬆症、関節疾患の診断に有用である。体液としては、血清、関節液等が用いられる。骨粗鬆症の診断は、主に血清OCIF濃度を測定することにより行う。関節疾患の診断は、主に関節液中のOCIF濃度を測定することにより行う。

本発明の診断は、特に骨粗鬆症の診断に有用である。体液としては、血清、関節液等が用いられる。

また本発明は、これらの診断に用いられるモノクローナル抗体に関する。

このようなモノクローナル抗体としては、モノマー型及びダイマー型のOCIFを等しく認識するモノクローナル抗体、ダイマー型のOCIFのみを選択的に認識するモノクローナル抗体等がある。さらにこれらのモノクローナル抗体には、OCIFの異なるエピトープを認識し、抗原との解離定数が $2 \times 10^{-7} \text{M}$ 以下の高親和性を有するモノクローナル抗体がある。

さらに本発明は、これらのモノクローナル抗体を構成に含むOCIF測定用キットに関する。

本発明における診断方法は、診断対象者から血液（血清）、関節液等の体液を採取し、これを前記モノクローナル抗体を用いたOCIF測定用キットで評価することにより行なう。

本発明のモノクローナル抗体は、以下の方法により得ることができる。即ち、抗OCIFモノクローナル抗体の作製に必要な免疫用抗原であるヒトOCIFとしては、WO96/26217号公報記載の方法に従って、ヒト胎児肺繊維芽細胞、IMR-90の培養液から単離されたものが用いられる。又、免疫用抗原として、遺伝子組み換えヒトOCIFを用いることもできる。遺伝子組み換えヒトOCIFは、ヒトOCIF cDNAを常法に従って発現ベクターに組み込み、CHO細胞、BHK細胞、Namalwa細胞等の動物細胞あるいは昆虫細胞などで発現させ、精製することにより得ることができる。モノマー及びダイマー型OCIFは、Tsudaらの方法（Biochem. Biophys. Res. Commun. 234, 137-142 (1997)）に従い、逆相クロマトグラフィーによりそれぞれ精製することができる。又、逆相クロマトグラフィーの代わりに、SPセファロース、硫酸化セルロファイン、及びリソースSカラム

クロマトグラフィーを組み合わせることにより、両タイプのOCIFをそれぞれ精製することができる。これらの抗原により哺乳動物を免疫し調製した脾臓細胞か、あるいはin vitro 法により免疫したリンパ球細胞を、骨髓腫細胞株（ミエローマ）などと融合させハイブリドーマを作製することができる、このハイブリドーマ培養液について、高度に精製されたモノマー型OCIFあるいはホモダイマー型OCIFをそれぞれ抗原として用い評価することによって、モノマー型及びホモダイマー型OCIFを等しく認識するモノクローナル抗体、あるいはホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選択、クローニングして樹立することができる。また、樹立した安定なハイブリドーマをそれぞれ培養することにより、目的とする抗体を得ることができる。

ハイブリドーマの作製にあたって哺乳動物を使用する場合は、特に限定されないが、マウスやラットなどの小動物を用いるのが一般的である。免疫は、抗原であるOCIFを生理食塩水などで適当な濃度に希釈し、この溶液を静脈内や腹腔内に投与し、これに必要な応じてフロイント完全アジュバントを併用投与し、動物に1～2週間の間隔で3～4回程度投与する方法が一般的である。本発明におけるOCIFに高親和性（解離定数が 2×10^{-7} M以下）の抗OCIFモノクローナル抗体の作製に当たっては、目的のモノクローナル抗体が得られやすいように1週間間隔で3回免疫し、更に抗原とフロイント不完全アジュバントを併用して1週間間隔で4回追加免疫し、出来るだけ血中抗OCIFタイターを高める。このようにして免疫された動物を最終免疫後3日目に解剖して、脾臓を摘出し、脾臓細胞を免疫細胞として使用するのが良い。免疫細胞と細胞融合するマウス由来のミエローマとしては、例えばp3/x63-Ag8、p3-U1、NS-1、MPC-11、SP-2/0、FO、P3x63 Ag8. 653及びS194などが例示できる。又、ラット由来の細胞としてはR-

210 などの細胞株がある。ヒト型の抗体を生産する場合には、ヒトBリンパ球を in vitro で免疫し、ヒトミエローマ細胞やEBウイルスにより形質転換した細胞株と細胞融合させることにより、ヒト型の抗体を生産することができる。

免疫された細胞とミエローマ細胞株との融合は公知の方法、例えばKoehler と Milsteinらの方法 (Koehler et al., Nature, 256, 495-497, 1975) が一般的に使用されるが、電気パルスを利用した電気パルス法なども使用可能である。免疫リンパ球とミエローマ細胞株は、通常行われている細胞数の比率に混合し、一般に使用される細胞培養用培地 (牛胎児血清、FCS 不含) にポリエチレングリコールを添加して融合処理を行い、FCS添加HAT選択培地で培養を行い、融合細胞 (ハイブリドーマ) を選別する。

モノマー型及びホモダイマー型OCIFを等しく認識する抗体、及びホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識する抗体をそれぞれ生産するハイブリドーマを、ELISA、プラーク法、オクタロニー法、凝集法など通常抗体の検出に使用されている方法を用いて選択することができる。精製モノマー型及びホモダイマー型OCIFを用いたELISAで、最も簡便且つ精度良く目的とする抗体を検定することができる。特に、本発明による高親和性抗体 (解離定数が 2×10^{-7} M以下) を得るには、通常のソリッドフェーズELISAでは困難であった。即ち、通常のソリッドフェーズELISAでは、抗原を固相化した96ウェルイムノプレート (Nunc社) にハイブリドーマ培養液 (50-100 μ l) を加え一次反応を行い、次いで酵素標識、例えば、パーオキシダーゼ (POD) 標識した抗マウスIgG 抗体を加えて第二次反応を行ない、酵素基質溶液 (50-100 μ l) を加えて酵素反応後、各ウェルの吸光度を測定する。この際、高い吸光度を示すハイブリドーマ培養液は、そのハイブリドーマが抗原親和性が低い抗体を大量に生産している場合と、その生産性が低くても、極めて抗原親和性が高い抗体を生産している場合の両方

が存在することを示しており、そのどちらであるかを容易に判別できない。そこで、本発明においては、後者の抗原親和性の高い抗体生産ハイブリドーマを比較的容易に識別できるように、以下のようにソリッドフェーズELISAを改良した。即ち、抗原を固相化した96ウェルイムノプレートの各ウェルにヒト血清あるいは牛血清を添加し、次いでハイブリドーマ培養液を少量各ウェルに添加し、第一次反応を約80～90%血清存在下で実施することにより、生産性が良好であるが、抗原親和性が低い抗体産生ハイブリドーマを排除でき、抗原親和性の高い抗体産生ハイブリドーマを選択的にスクリーニングすることが可能になった。この改良ソリッドフェーズELISAにおいて、モノマー型OCIF及びホモダイマー型OCIFを抗原として、両タイプのOCIFを等しく認識する抗体を生産するハイブリドーマ及びホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識する抗体を生産するハイブリドーマをそれぞれ選び、限界希釈法により3～5回クローニングし、安定な抗体生産株として樹立する。このようにして樹立されたハイブリドーマは通常の培養方法により継代培養可能であり、必要に応じて凍結保存できる。ハイブリドーマは常法により培養して、その培養液から回収することができる。また、ハイブリドーマを哺乳動物の腹腔内に移植することにより得られる腹水から抗体を回収することもできる。培養液あるいは腹水中の抗体は、塩析法、イオン交換及びゲル濾過クロマトグラフィー、プロテインA又はGを用いるアフィニティークロマトグラフィーなど、抗体の精製に通常用いられる方法により精製することができる。得られた抗体は、モノマー型及びホモダイマー型OCIFを等しく認識する抗体、及びホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識できる抗体で、それぞれOCIF量（モノマー型OCIF＋ホモダイマー型OCIF）及びホモダイマー型OCIFのみの測定に利用することができる。これらの抗体は放射性アイソトープや 酵素ラベルすることにより、ラジオイムノアッセイ(RIA)や

エンザイムイムノアッセイ(ELISA)として知られている測定系に用いることができ、OCIF量(モノマー+ホモダイマー型OCIF量)やホモダイマー型OCIFのみの量を測定することができる。特に本発明によるホモダイマー型OCIFを特異的に認識する抗体の存在は、モノマー型OCIFとホモダイマー型OCIFには異なるエピトープが存在することを明らかにすると共に、この抗体はモノマー型OCIFには存在せずホモダイマー型OCIFのみに存在するエピトープを認識する抗体であることを示している。本発明によって得られるモノマー型OCIF及びホモダイマー型OCIFを等しく認識する抗体を固相化抗体として、又放射性アイソトープあるいは酵素標識した第二次抗体としてそれぞれ他の共通エピトープでモノマー型OCIF及びホモダイマー型OCIFを等しく認識する抗体及びホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識する抗体を用いれば、OCIF量及びホモダイマー型OCIF量をそれぞれ測定することができるという特徴を有する。さらに、ホモダイマー型OCIFのみを測定したい場合、固相化抗体として、以下の実施例6(第1表)に開示するホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識する0I-26抗体、標識抗体としてモノマー型OCIF及びホモダイマー型OCIFを等しく認識する0I-19あるいは0I-4抗体を使用することもできる。これらの測定系を用いることにより、血液、尿、及び関節液などの生体試料や細胞培養液中のOCIF量及びホモダイマー型OCIF量のみを容易に且つ高感度で測定することができる。

本発明のヒトOCIFを測定するためのキットは、(i)第1次抗体または第2次抗体のいずれか一方の抗体が0I-19あるいは0I-26抗体であり、且つ(ii)他の抗体が0I-4抗体であることを除いて、通常のサンドイッチ法における試薬(reagent)の組合せに基づいてキットが構成される。すなわち、本発明の免疫学的測定キットは、(1)不溶性担体に固定化された第1次抗体、(2)標識化された第2次

抗体、(3) 溶解剤、(4) 洗浄剤および(5) 標識物質が酵素である場合には、酵素活性を測定するための基質および反応停止剤を含んでいる。不溶性担体としては、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリルニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド、ラテックス、ラテックスに金属等をメッキした磁性微粒子などの高分子、その他紙、ガラス、金属、アガロースおよびこれらの組合せなどを例示することができる。また不溶性担体の形状としては、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管、多孔性フィルターなどの種々の形状であることができる。また、標識化抗体の標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質および放射性物質等を使用するのが有利である。酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、インベルターゼ等を、蛍光物質としては、フルオレッセインイソチオシアネート、フィコビリプロテイン等を、発光物質としては、イソルシノール、ルシゲニン等を、そして放射性物質としては、 I^{125} 、 I^{131} 、 C^{14} 、 H^3 等を用いることができるが、これらは例示したものに限らず、免疫学的測定法に使用し得るものであれば、他のものでも使用できる。

標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として H_2O_2 を用い、発色剤として2, 2'-アジノジ- [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、o-フェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、ホモセバニリン酸、チラミン等を、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質として o-ニトロフェニルフォスフェート、4-メチルウンベリフェリルリン酸

等を、酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン-ジ- (β -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド等を用いることができる。前記免疫学的測定キットにおいて(3) 溶解剤としては、免疫学的測定に通常使用されるものであればよく、例えばリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、酢酸緩衝液などを含んだpHが6.0~8.0の範囲のものが好適な例として示される。さらに(4) 洗浄剤としては、同様に免疫学的測定に一般的に使用されているものがそのまま使用される。その例としては、生理食塩水、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液およびこれらの混合液が挙げられる。これらの洗浄剤にはさらにTriton X-100、Tween 20またはBrij35の如き非イオン系界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム、CHAPSの如きイオン系界面活性剤を加えてもよい。

図面の簡単な説明

第1図は、実施例7の0I-19抗体と0I-4抗体によるELISAの検量線を示す。

〔符号の説明〕

○：ホモダイマー型OCIF

●：モノマー型OCIF

第2図は、実施例7の0I-26抗体と0I-4抗体によるELISAの検量線を示す。

〔符号の説明〕

○：ホモダイマー型OCIF

●：モノマー型OCIF

第3図は、実施例8の骨粗鬆症患者及び健常人の血中OCIF濃度を示す。

第4図は、実施例8の尿中ピリジノリンと血中OCIF濃度の関係を示す。

第5図は、実施例8の尿中デオキシピリジノリンと血中OCIF濃度の関係を示す。

第6図は、実施例9の関節腫張を認めた患者の関節液中のOCIF濃度を示す。

〔符号の説明〕

RA: 慢性関節リウマチ

OA: 変形性関節症

Tr: 外傷

G: 痛風発作

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

〔実施例1〕

抗原用モノマー型OCIF及びホモダイマー型OCIFの精製

WO96/26217号公報記載のOCIF生産CHO細胞を、EX-CELL 301 培地（JRHBioScience社）に 1×10^5 cells/mlとなるように播種し、細胞培養用ジャー（2リットル容量）を用いて37°Cで7日間培養した。得られた培養液に0.1 % になるようにCHAPS（3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate、シグマ社）を加え、酢酸でpH 6.0に調整した後、0.22 μ m のフィルター（ミリディスク、ミリポア社）で濾過した。培養液を、予め0.1 % CHAPSを含む50 mM ビストリス- 塩酸緩衝液、pH 6.0で予め平衡化したSPセファロースHPカラム（2.6 \times 10cm、ファルマシア社）に負荷し、同緩衝液で洗浄した後、流速4 ml

／分、100 分間でNaCl濃度が1 Mになる直線勾配で溶出を行い、8 mlずつフラクショネーションした。W096/26217号記載の方法に従い各フラクションのOCIF活性を測定し、OCIF画分を得た。このOCIF画分を0.1 % CHAPSを含む50 mMビストリスー塩酸緩衝液、pH 6.0で10倍希釈した後、予め 50mM ビストリスー塩酸緩衝液、pH 6.0で平衡化した硫酸化セルロフィンカラム(2.6×10cm、生化学工業社)に負荷した。このカラムを、0.1 % CHAPSを含む50 mM ビストリスー塩酸緩衝液、pH 6.0で洗浄した後、流速4 ml/ 分、100 分間でNaCl濃度が1.5 Mになる直線勾配で溶出を行い、8 mlずつフラクショネーションした。各フラクションのOCIF活性を、前記と同様の方法で測定した。又、各フラクションの一部を非還元条件下でSDS-PAGEにかけ、OCIF活性を有し、その分子量が約60 kDaを示す分画を集め、画分1とした。又、OCIF活性を有し、非還元条件下でSDS-PAGE で約 120kDa の分子量を示す分画を集めて、画分2とした。画分1及び2をそれぞれ0.1 % CHAPSを含む50 mM トリスー塩酸緩衝液、pH 7.0で10倍に希釈した。希釈して得られた両画分をそれぞれ、予め0.1 %CHAPS を含む50 mM トリスー塩酸緩衝液、pH 7.0で予め平衡化したリソースSカラム (0.64×3cm、ファルマシア社)に負荷し、0.01% polysorbate 80 を含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0で洗浄した後、流速1 ml/ 分、15分間でNaCl濃度が0.6 Mになる直線勾配で溶出を行い、0.5 mlずつフラクショネーションした。画分1及び画分2をそれぞれ負荷することによって得られた各フラクションのOCIF活性を前記同様に測定し、OCIF活性を有するフラクションを集めて、画分1からモノマー型OCIF、画分2からホモダイマー型OCIFを得た。

〔実施例2〕

マウスの免疫及びハイブリドーマの作製

実施例1記載の方法で精製されたモノマー型OCIF及びホモダイマー型OC

I Fを、それぞれ100 $\mu\text{g/ml}$ になるように生理食塩水に溶解した。このようにして調製した両タイプのOCIFを等量含む混合液に、同容量のフロイント完全アジュバントを加え良く乳化した後、Balb/cマウス1匹当たり腹腔内に200 μl ずつ1週間間隔で3回投与し、マウスを免疫した。次に、両タイプのOCIFをそれぞれ25 $\mu\text{g/ml}$ 含む混合液に、同容量のフロイント不完全アジュバントを添加し充分乳化したものを、上記Balb/cマウス1匹あたり200 μl ずつ、1週間間隔で4回追加免疫した。4回目の追加免疫の1週間後、両タイプのOCIFをそれぞれ100 $\mu\text{g/ml}$ 含む混合液をBalb/cマウス1匹当たり100 μl ずつ静脈内に投与した。最終免疫後3日目に脾臓を摘出、脾臓細胞を分離し、マウスミエローマ細胞P3x63-AG8.653 (ATCC CRL-1580) と公知の方法 (Koehler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495 (1975)) に従い細胞融合した。融合終了後、細胞懸濁液をヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むHAT培地中で10日間培養した。ミエローマ細胞が死滅し、ハイブリドーマが出現した後、HAT培地からアミノプテリンを除いたHT培地に培地交換し培養を継続した。

〔実施例3〕

ハイブリドーマの選択及びクローニング

融合10日後にハイブリドーマの出現を認めたので、上記に記載した改良ソリッドフェーズELISAにより、モノマー型OCIF及びホモダイマー型OCIFを等しく認識する高親和性抗体及びホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識する高親和性抗体生産ハイブリドーマの選択を行った。即ち、予めモノマー型及びホモダイマー型OCIFをそれぞれ5 $\mu\text{g/ml}$ になるように0.1 M炭酸水素ナトリウム溶液 (pH9.6) に溶解し、それぞれの抗原溶液を50 μl ずつ96ウェルイムノプレート (Nunc社) の各ウェルに加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置しそれぞれの抗原を固相化した。各ウェル中の抗原溶液を捨て、0.1 % polysorbate 20 を含むリン酸塩

緩衝生理食塩水 (PBS-P) で洗浄し、各ウェルに $40\mu\text{l}$ の牛胎仔血清 (ハイクローン社) を加えた。次いで、各ウェルに $10\mu\text{l}$ のハイブリドーマ培養上清を加え、80% 血清濃度下、室温で 2 時間反応させた。反応後、プレートを PBS-P で洗浄し、25% ブロックエースを含む生理食塩水で 5000 分の 1 に希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス IgG (KPL 社) を各ウェルに $50\mu\text{l}$ 加え、室温で 2 時間反応させた。プレートを PBS-P で洗浄した後、各ウェルに $50\mu\text{l}$ の酵素基質溶液 (TMB, ScyTek 社) を加えて発色させた後、反応停止液 (stopping reagent, ScyTek 社) $50\mu\text{l}$ を加えて酵素反応を停止した。各ウェルの 450nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (イムノリーダー NJ2000、日本インターメッド社) を用いて測定し、抗体生産ハイブリドーマを選択した。特に高い吸光度を示し、しかもモノマー型及びホモダイマー型 OCIF を等しく認識する抗体あるいはモノマー型 OCIF を認識せず、ホモダイマー型 OCIF のみを特異的に認識する抗体生産ハイブリドーマを選択し、それぞれのハイブリドーマから限界希釈法により 3 ～ 5 回クローニングを繰り返すことにより、安定な抗体生産ハイブリドーマを樹立した。得られた抗体生産株の中から、さらに目的抗体の生産性が高いハイブリドーマ株を選別した。

このようにしてモノマー型 OCIF 及びホモダイマー型 OCIF を等しく認識する 0I-19 抗体あるいは 0I-4 抗体を産生するハイブリドーマ 0I-19 及び 0I-4 を得た。またホモダイマー型 OCIF のみを特異的に認識する 0I-26 抗体を産生するハイブリドーマ 0I-26 を得た。これらを工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、0I-4 には受託番号 FERM BP-6419、0I-19 には受託番号 FERM BP-6420、0I-26 には受託番号 FERM BP-6421 がそれぞれ付与されている。

〔実施例 4〕

モノクローナル抗体の生産及び精製

実施例 3 で得られた目的の抗体、即ち高親和性でモノマー型及びホモダイマー型 O C I F を等しく認識する抗体及びホモダイマー型 O C I F のみを特異的に認識する抗体生産ハイブリドーマをそれぞれ培養し、マウス一匹当たりそれぞれのハイブリドーマを 1×10^6 細胞ずつ、予めプリスタン（アルドリッチケミカル社）を投与しておいた Balb/c 系マウスの腹腔内に移植した。2 週間後、蓄積した腹水を採取し、本発明のモノクローナル抗体を含む腹水を得た。プロテイン A カラム（ファルマシア社）クロマトグラフィーにより、腹水から精製抗体を得た。

〔実施例 5〕

モノクローナル抗体の解離定数 (K_d 値) の測定

Betrand Friguet らの方法 (Journal of Immunological Methods, 77, 305-319, 1986) に従い、モノクローナル抗体の解離定数を測定した。即ち、実施例 4 で得られた精製抗体を、5ng/ml に 40% ブロックエース（雪印乳業社）、0.1 % polysorbate 20 を含む 0.2M Tris-HCl pH7.4 (1 次バッファー) で希釈し、これに実施例 1 記載の精製モノマー型あるいはホモダイマー型の遺伝子組み換え O C I F (r O C I F) を 6.25ng/ml ~ $10 \mu\text{g/ml}$ になるように 1 次バッファーで希釈したものを等容量混ぜ、4 °C で 15 時間静置することにより O C I F とモノクローナル抗体を結合させた。15 時間後、O C I F と未結合の抗体をモノマー型あるいはダイマー型の r O C I F ($10 \mu\text{g/ml}$ 、100 μl /ウェル) を固相化したソリッドフェーズ E LISA にて測定することにより、モノクローナル抗体のモノマー型及びホモダイマー型 O C I F に対する解離定数を算定した。

〔実施例 6〕

モノクローナル抗体のクラス及びサブクラスの検定

本発明のモノクローナル抗体のクラス及びサブクラスを、イムノグロブリンクラス及びサブクラス分析キット（アマシャム社）を用いて検定した。検定は、キ

ットに指示されているプロトコールに従い実施した。実施例5及び6で得られた結果を第1表に示す。

第1表

| 抗体名 | サブクラス | 解離定数 (対モノマー) | 解離定数 (対ダイマー) |
|-------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0I-4 | IgG ₁ (κ) | 7.3×10^{-10} | 9.9×10^{-12} |
| 0I-19 | IgG ₁ (κ) | 7.0×10^{-10} | 1.2×10^{-11} |
| 0I-26 | IgG ₁ (κ) | — | 1.5×10^{-7} |

これらの結果より、抗体0I-4及び0I-19はモノマー型及びホモダイマー型OCIFをほぼ同等に認識する抗体であり、抗体0I-26はホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識する抗体であることが確認された。又、全ての抗体はIgG₁に属し、モノマー型あるいはホモダイマー型OCIFに対する解離定数は 2×10^{-7} M以下の、極めて親和性の高い抗体であることが明らかとなった。

〔実施例7〕

OCIFのELISAによる測定

上記方法により得られた3種の抗体0I-4、0I-26及び0I-19をそれぞれ固相抗体と標識抗体として、サンドイッチELISAを構築した。抗体の標識は、マレイミド活性化パーオキシダーゼキット（ピアス社）を用いて行った。モノマー型及びホモダイマー型OCIFを等しく測定するELISAには0I-19抗体を1次抗体として、あるいはホモダイマー型OCIFを特異的に測定するELISAには0I-26抗体を1次抗体として、それぞれ10 μg/mlになるよう0.1M 炭酸水素ナトリウム溶液（pH9.6）に溶解し、100 μl ずつ96ウェルイムノプレート（Nunc社）の各ウェルに加え、4℃で一晩静置し固相化した。各ウェルの溶液を捨て、50%濃度のブロックエース（雪印乳業社）300 μl を加え、室温で2時間静置しブロッキングした。ブロッキング後、プレートを0.1% polysorbate 20 を含むリ

ン酸塩緩衝生理食塩水(PBS-P)で洗浄した。モノマー型OCIF及びホモダイマー型OCIFをそれぞれ40%ブロッケース(雪印乳業社)及び0.1% polysorbate 20を含む0.2M Tris-HCl (pH 7.4)(一次バッファー)に溶解、希釈し、種々の濃度の両タイプOCIF溶液を調製した。種々の濃度に調製したモノマー型及びホモダイマー型OCIF溶液それぞれを100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で2時間反応させた。2時間後、プレートをPBS-Pで洗浄し、25%ブロッケース(雪印乳業社)及び0.1% polysorbate 20を含む0.1M Tris-HCl (pH7.4)(2次バッファー)で希釈したPOD標識OI-4抗体をモノマー型及びホモダイマー型OCIFを等しく認識する抗体として各ウェルに100 μ l 加え、室温で2時間反応させた。プレートをPBS-Pで洗浄した後、各ウェルに100 μ l の酵素基質溶液(TMB, ScyTek社)を加えて発色させた後、反応停止液(stopping reagent,

ScyTek 社)を100 μ l ずつ各ウェルに加えて酵素反応を停止した。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。第一次抗体としてモノマー型及びホモダイマー型OCIFをほぼ等しく認識する抗体、OI-19を使用した時の結果を第1図に、又ホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識する抗体OI-26を用いた時の結果を図2に、それぞれ示す。この結果、第1図に示したように、モノマー型及びホモダイマー型OCIFをほぼ等しく認識する抗体、OI-19を固相抗体とし、両タイプのOCIFを等しく認識する抗体、OI-4をPOD標識抗体とした時のサンドイッチELISAの測定感度は約25 pg/mlで極めて微量のOCIFを測定することができることが明らかになった。又、第2図に示したように、ホモダイマー型OCIFのみを特異的に認識する抗体OI-26を固相抗体とし、モノマー型及びホモダイマー型OCIFを等しく認識する抗体OI-4をPOD標識抗体としたサンドイッチELISAの測定感度は50 pg/mlで、高感度でホモダイマー型OCIFのみを測定できることを認めた。

〔実施例 8〕

健常人及び骨粗鬆症患者の血清中 OCIF の測定

健常人及び骨粗鬆症患者（日本骨代謝学会の診断基準に基づく）の血清中の OCIF 濃度を、実施例 7 記載の OCIF の ELISA 系（モノマー型 OCIF + ホモダイマー型 OCIF）を一部改良して測定した。即ち、OCIF 濃度（モノマー型 OCIF + ホモダイマー型 OCIF）の測定には、両タイプの OCIF を等しく認識する抗体 0I-19 を実施例 7 と同様に 96 ウェルイムノプレートに固相化し、各ウェルに精製マウス IgG（カペル社）を 20 μ g/ml になるよう加えた 1 次バッファー（40% ブロックエース及び 0.1 % polysorbate 20 を含む 0.2 M Tris-HCl, pH 7.4）を 50 μ l 加え、次いで 1 次バッファーで 4 倍希釈した各ヒト血清を 50 μ l 加え、室温で 2 時間静置した。0.1 % polysorbate 20 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水（PBS-P）で 6 回洗浄後、両タイプの OCIF を等しく認識する抗体 0I-4 の POD 標識体を精製マウス IgG を 10 μ g /ml になるように加えた 2 次バッファー（25% ブロックエース及び 0.1 % polysorbate 20 を含む 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4）で 3000 倍に希釈した溶液を 100 μ l ずつ各ウェルに加えて、室温で 2 時間静置した。PBS-P で 6 回洗浄後、酵素基質溶液（TMB, ScyTek 社）を 100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 20 分間反応させた後、反応停止液（stopping reagent, ScyTek 社）を 100 μ l ずつ各ウェルに添加して、反応を停止した。各ウェルの 450nm の吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。既知量の OCIF を含む 1 次バッファーについても同様に操作し、第 1 図と同様に OCIF の検量線を作製し、血清試料の吸光度から血清中の OCIF 濃度を求めた。

骨粗鬆症患者及び健常人の、血清中の OCIF（モノマー型 OCIF + ホモダイマー型 OCIF）濃度の試験結果を第 3 図に示す。第 3 ～ 5 図に示す結果の有意差検定は、Student's non-paired t 検定にて行った。この結果、骨粗鬆症患者と健常

人との間には、血清OCIF（モノマー型OCIF+ホモダイマー型OCIF）濃度に有意な差異が認められ、骨粗鬆症患者の血清OCIF濃度は、健常人のそれよりも有意に高かった。よって、血清OCIF濃度を測定することにより、骨粗鬆症患者の病態を把握できることから、OCIFは骨粗鬆症を判定する新しい骨代謝マーカーになり得ることが明らかとなった。

又、健常人と骨粗鬆症患者の血清OCIF（モノマー型OCIF+ホモダイマー型OCIF）濃度と尿中ピリジノリン濃度の関係を第4図に、尿中デオキシピリジノリン濃度との関係を第5図に、それぞれ示す。ここで、ピリジノリン濃度42 pmol/ μ mol Cr（クレアチニン 1 μ mol 当りのピリジノリンpmol量）、デオキシピリジノリン濃度6.2pmol/ μ mol Crは、それぞれ日本人の正常値の上限値である。この結果、ピリジノリン、デオキシピリジノリン濃度が高値を示す患者の血清OCIF濃度は、有意に高かった。ピリジノリン及びデオキシピリジノリンはコラーゲンの架橋分子であり、コラーゲンが骨基質に取り込まれた後に骨基質内で生成され、骨吸収時の骨破壊により放出される。これらの分子は骨吸収マーカーとしての特異性が高いとされており、臨床検体の評価に幅広く利用されているものである。OCIF濃度とこの二つのマーカーとの相関が認められたことにより、血清中OCIF濃度は骨代謝マーカーとして有用であることが明らかとなった。

〔実施例9〕

関節腫張を認めた患者の関節液中OCIF濃度の測定

関節疾患の治療を目的として病院を訪れ、診察の結果明らかな関節腫張を認めた慢性関節リウマチ(RA)患者43例、変形性関節症(OA)患者6例、外傷(Tr)患者3例、および痛風発作(G)患者6例よりインフォームドコンセントを得た上で関節液を採取した。これらの関節液中のOCIF濃度を、実施例8に記載したOCIFのELISA系（モノマー型OCIF+ホモダイマー型OCIF）を一部改変して測定

した。即ち、関節液は1次バッファーで16倍希釈した後、その50 μ lを抗体OI-19を固相化した96ウェルイムノプレートの各ウェルに加えた。この操作以外の全ての操作は、実施例8の方法と同様に実施した。

関節腫張を認めた患者関節液中OCIF（モノマー型OCIF+ホモダイマー型OCIF）濃度の試験結果を第6図に示す。また、第6図に示したデータの統計解析にはKruskal-Wallis TestおよびMann-Whitney Testを使用した。この結果、関節液中のOCIF濃度は、痛風発作(G)例に比しRA患者の方が有意に低値を示した($p=0.0023$)。また、6例のOA患者の関節液中のOCIF濃度の最低値は4.79 ng/mlであった一方、関節液中のOCIF濃度が、4.0 ng/ml以下の低値を示したRA患者は43例中15例に達した。これらの結果から、関節液中のOCIF濃度が低値を示した一部のRA患者の関節において、OCIFの不足により破骨細胞の形成と活性が抑制されていない可能性が示唆された。また、OCIF-ELISAが慢性関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)、外傷(Tr)、および痛風発作(G)の病態の診断に有用であることが示された。

〔実施例10〕

慢性関節リウマチ(RA)患者の膝関節液中OCIF濃度と病態の関係

関節液中のOCIF濃度と関節破壊の進行との相関を検討するため、retrospective cohort studyを慢性関節リウマチ(RA)患者2例につき、実施した。

(症例1、66才、男性)

1982年(50才時)、多関節痛を自覚。1983年、病院で初診を受け、American College of RheumatologyのRAの分類基準を満たしRAと診断された。以後、抗リウマチ薬(メルカプターゼ)により一時寛解となり、抗リウマチ薬の投与を中止した。1990年、RAを再発し、抗リウマチ薬の投与を再開した。1992年3月18日、右膝関節が腫張し、穿刺により関節液を採取した。この時の関節液中のO

C I F 濃度は23.6 ng/mlであり、高値を示した（実施例 9 で示した43例のRA患者の関節液中のO C I F 濃度の中央値は約 6ng/ml）。この時の血漿のC R P は 5.4 mg/dlであり、明らかに炎症反応を呈した。C R P は完全には陰性化はせず、1997年まで3mg/dl前後を呈していた。膝X-pは1983年から1997年まで確認されているが、変形性関節症(OA)の変化が主体であり、手指関節および手関節においても骨糜爛は認められなかった。

（症例 2、60才、女性）

1987年（49才）、多関節痛を自覚。1993年 8 月17日、病院で初診を受け、American College of Rheumatology のR A の分類基準を満たしR A と診断された。このとき右膝関節が腫張しており、穿刺により関節液を採取した。この時の関節液中のO C I F 濃度は 3.0ng/ml と低値を示し、また血漿のC R P は 13.7 mg/dl と強い炎症反応を呈していた。その後、抗リウマチ薬（メソトレキセート）の投与によりC R P は徐々に低下し、1994年 3 月18日には 4.1mg/dl 、同年 6 月27日には 1.1 mg/dlにまで低下した。しかし膝X-pは、Larsen分類（Larsen A. et al., Acta Radiol. Diag. 18, 481-491, 1977）によると、1993年 9 月 1 日には grade III 、1994年 3 月18日には grade IV 、同年 6 月27日には grade Vと、関節破壊は確実に進行し、同年10月 4 日には、人工関節置換術を施行された。

上記 2 例、即ち関節破壊の進行が穏やかであった症例 1 と関節破壊が進行した症例 2 での関節液中のO C I F 濃度の測定結果から、リウマチによる関節破壊の危険度の評価や関節破壊の治療効果の評価に関節液中のO C I F 濃度測定が有用であることが示された。

〔実施例 1 1〕

モノマー型およびダイマー型O C I F 測定用キット1(80検体)

① OI-19 抗体を実施例 7 の方法で固相化し、予めBlock Ace でブロッキングし

た96ウェルプレート: 1 枚

- ② 実施例7の方法でPOD標識化したOI-4抗体: 10 μ l(1000倍濃度)
- ③ 遺伝子組み換え型OCIF(モノマー型)標準品: 0.5ng/ml 400 μ l
- ④ 検体の希釈液(0.01% Tween 20 と40% BlockAceを含む0.2M Tris-HCl 緩衝液、pH 7.4): 10ml
- ⑤ 標識抗体の希釈液(0.01% Tween 20 と25% BlockAceを含む0.1M Tris-HCl 緩衝液、pH 7.4): 10ml
- ⑥ 96 ウェルプレート洗浄のための洗浄液(0.1% Tween 20 を含むPBS(-)): 1 リットル
- ⑦ 標識化酵素活性を測定するための基質溶液(ここではTMB 溶液)および反応停止液(TMB stop reagent): 各10ml

ダイマー型OCIF測定用キット2(80検体)

- ① OI-26 抗体を実施例7の方法で固相化し、予めBlock Ace でブロッキングした96ウェルプレート: 1 枚
- ② 実施例7の方法でPOD標識化したOI-4抗体: 10 μ l(1000倍濃度)
- ③ 遺伝子組み換え型OCIF(ダイマー型)標準品: 0.5ng/ml 400 μ l
- ④ 検体の希釈液(0.01% Tween 20 と40% BlockAceを含む0.2M Tris-HCl 緩衝液、pH 7.4): 10ml
- ⑤ 標識抗体の希釈液(0.01% Tween 20 と25% BlockAceを含む0.1M Tris-HCl 緩衝液、pH 7.4): 10ml
- ⑥ 96ウェルプレート洗浄のための洗浄液(0.1% Tween 20を含むPBS(-)): 1 リットル
- ⑦ 標識化酵素活性を測定するための基質溶液(ここではTMB 溶液)および反応停止液(TMB stop reagent): 各10ml

測定方法（キット1およびキット2）

プレート①の各ウェルに希釈液④で希釈した検体及びヒト遺伝子組み換え型OCIF標準品③を段階希釈した溶液を100 μ l ずつ加える。室温にて約2時間放置した後、洗浄液⑥ 300 μ l でプレートの各ウェルを5～6回洗浄する。この洗浄操作には自動プレートウォッシャーを用いてもよい。洗浄したプレートの各ウェルにPOD標識したOI-4抗体②を希釈液⑤で1000倍希釈した溶液 100 μ l ずつを加え、再び室温にて約2時間放置する。洗浄液⑥でプレートの各ウェルを5～6回洗浄する。この洗浄操作には自動プレートウォッシャーを用いてもよい。酵素基質溶液⑦を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、室温にて20～30分放置する。各ウェルに反応停止液⑦を 100 μ l 加えることにより酵素反応を停止する。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定する。ヒト遺伝子組み換え型OCIF標準品③を段階希釈したものを加えた各ウェルの450nmの吸光度よりヒト遺伝子組み換え型OCIF濃度の検量線を作製し、この検量線から各検体のOCIF濃度を求める。

産業上の利用の可能性

本発明により、採取した体液（血液、関節液等）中のヒト破骨細胞形成抑制因子(OCIF)濃度を測定することにより、骨代謝異常症、特に骨粗鬆症及び関節疾患の診断を簡易的にかつ正確に行うことができる。本発明の診断には、前記モノクローナル抗体、及びそのモノクローナル抗体を用いたOCIF測定用キットが用いられるので、骨代謝異常、特に骨粗鬆症及び関節疾患の診断を前記のように簡易的かつ正確に行うことができるものである。本発明は、骨代謝異常症、特に骨粗鬆症及び関節疾患の診断方法、あるいは研究用分析試薬などに有用である。

微生物への言及

- ・当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託機関に寄託した日付：平成9年（1997）年10月16日

寄託機関の寄託について付した寄託番号：FERM BP-6419

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託機関に寄託した日付：平成9年（1997）年10月16日

寄託機関の寄託について付した寄託番号：FERM BP-6420

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託機関に寄託した日付：平成9年（1997）年10月16日

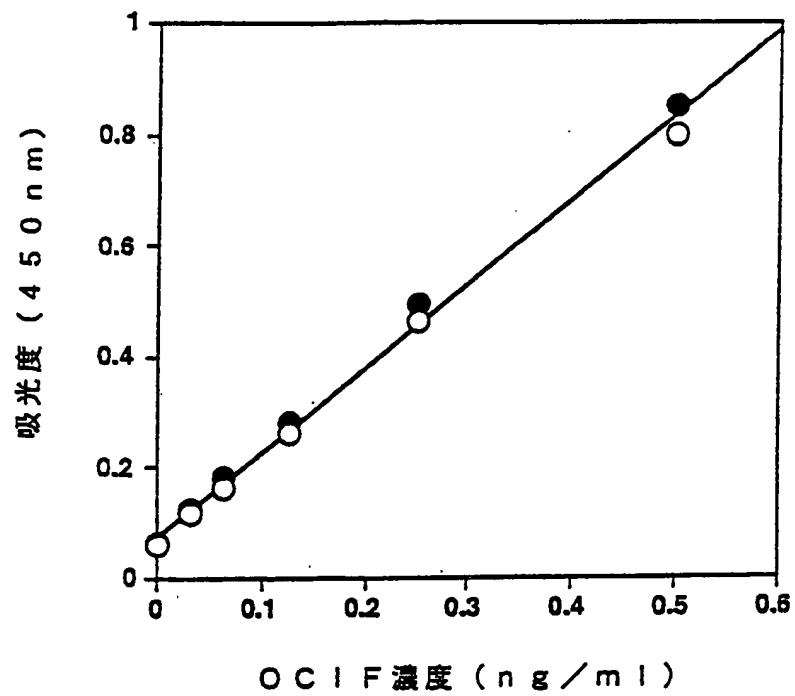
寄託機関の寄託について付した寄託番号：FERM BP-6421

請 求 の 範 囲

1. 採取した体液中の破骨細胞形成抑制因子(OCIF)の濃度を測定しその濃度によって骨代謝異常を診断することを特徴とする骨代謝異常症の診断方法。
2. 体液が血清または関節液である請求の範囲 1 に記載の骨代謝異常症の診断方法。
3. 骨代謝異常症が骨粗鬆症である請求の範囲 1 又は 2 に記載の骨代謝異常症の診断方法。
4. 骨代謝異常症が関節疾患である請求の範囲 1 又は 2 に記載の骨代謝異常症の診断方法。
5. 骨代謝異常症が慢性関節リウマチである請求の範囲 1 又は 2 に記載の骨代謝異常症の診断方法。
6. モノマー型OCIF及びダイマー型OCIFを等しく認識するモノクローナル抗体。
7. ダイマー型のOCIFのみを選択的に認識するモノクローナル抗体。
8. OCIFの異なるエピトープを認識し、抗原との解離定数が $2 \times 10^{-7} \text{M}$ 以下の高親和性を有する請求の範囲 6 又は 7 に記載のモノクローナル抗体。
9. OCIFの異なるエピトープを認識し、抗原との解離定数が 10^{-9}M 以下の高親和性を有するモノマー型OCIF及びダイマー型OCIFを等しく認識するモノクローナル抗体と、OCIFの異なるエピトープを認識し、抗原との解離定数の $2 \times 10^{-7} \text{M}$ 以下の高親和性を有するダイマー型のOCIFのみを選択的に認識するモノクローナル抗体とを構成に含むOCIF測定用キット。

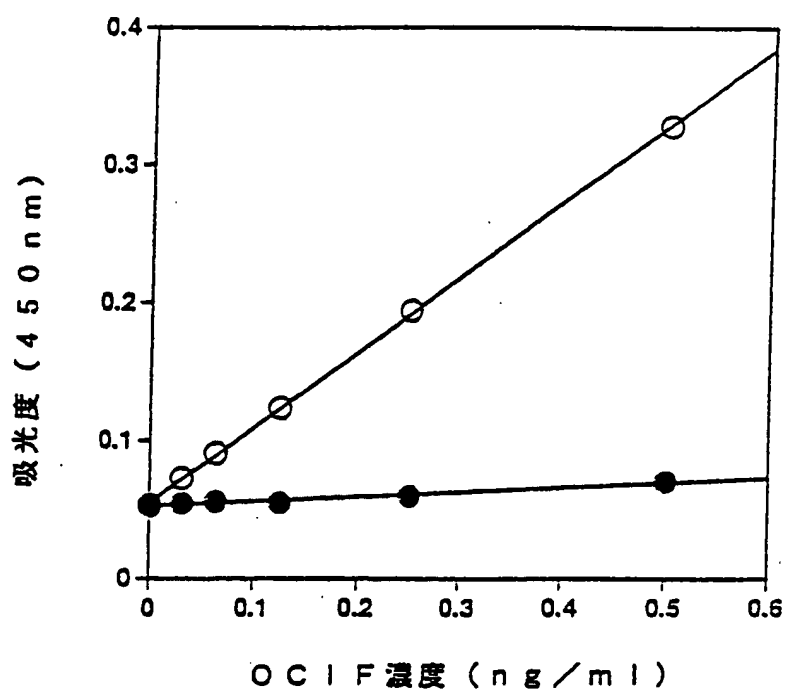
1 / 6

第1図



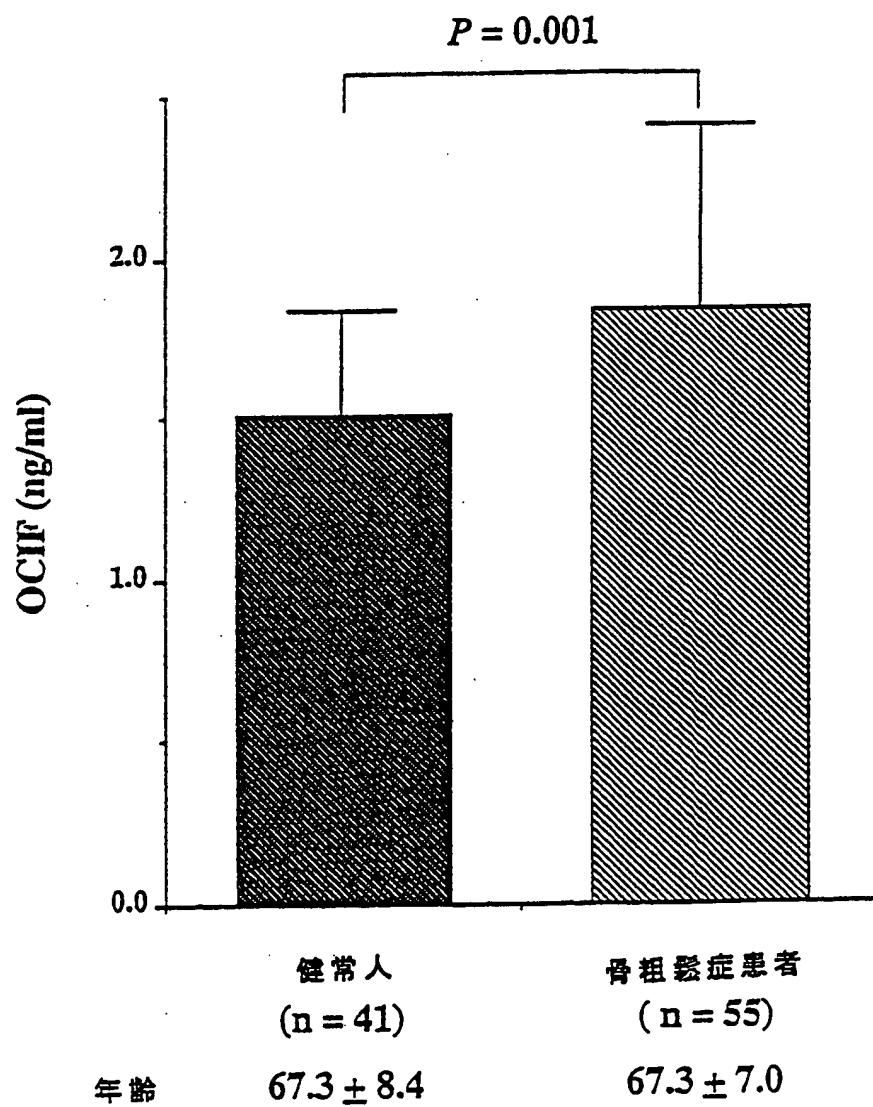
2 / 6

第2図



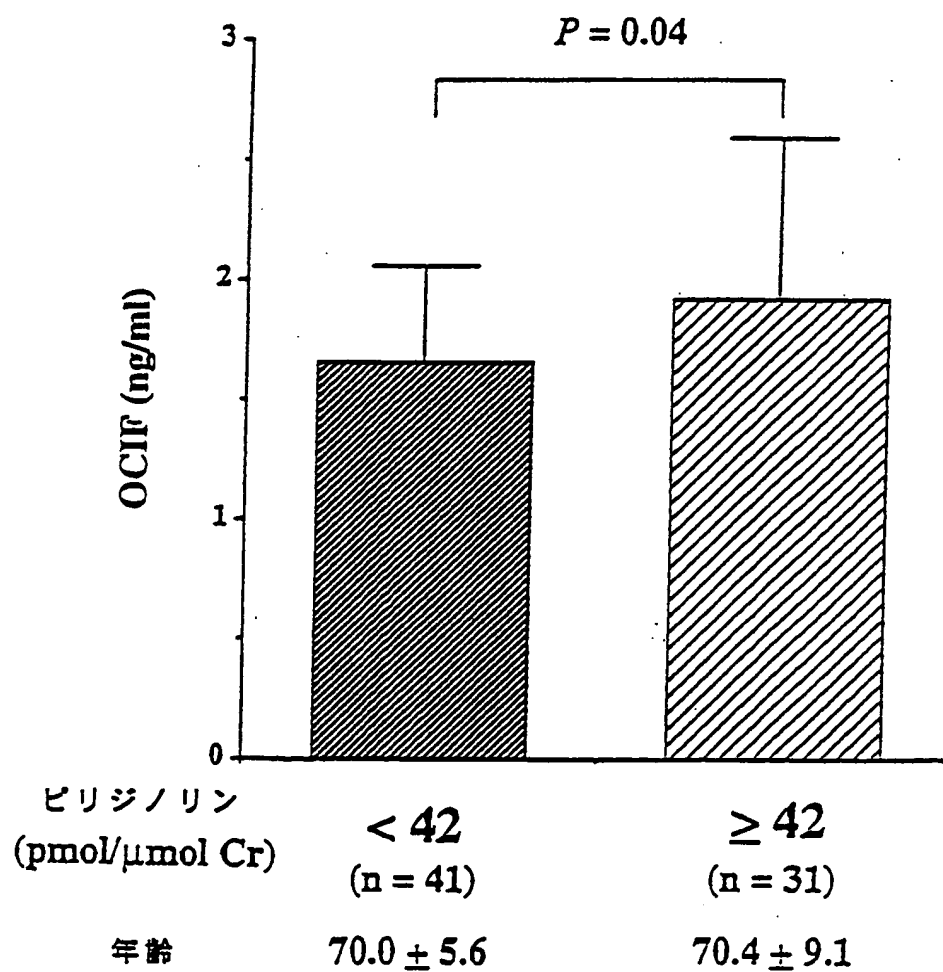
3 / 6

第3図



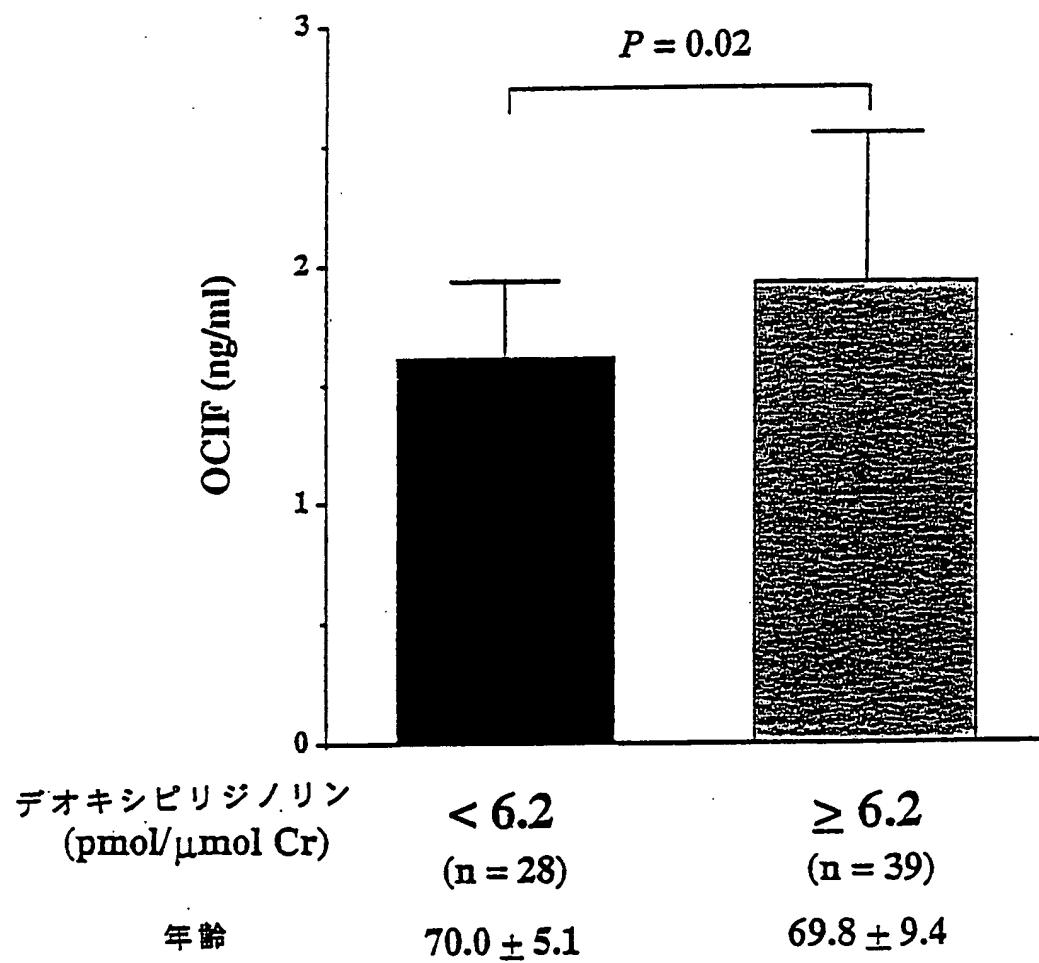
4 / 6

第4図



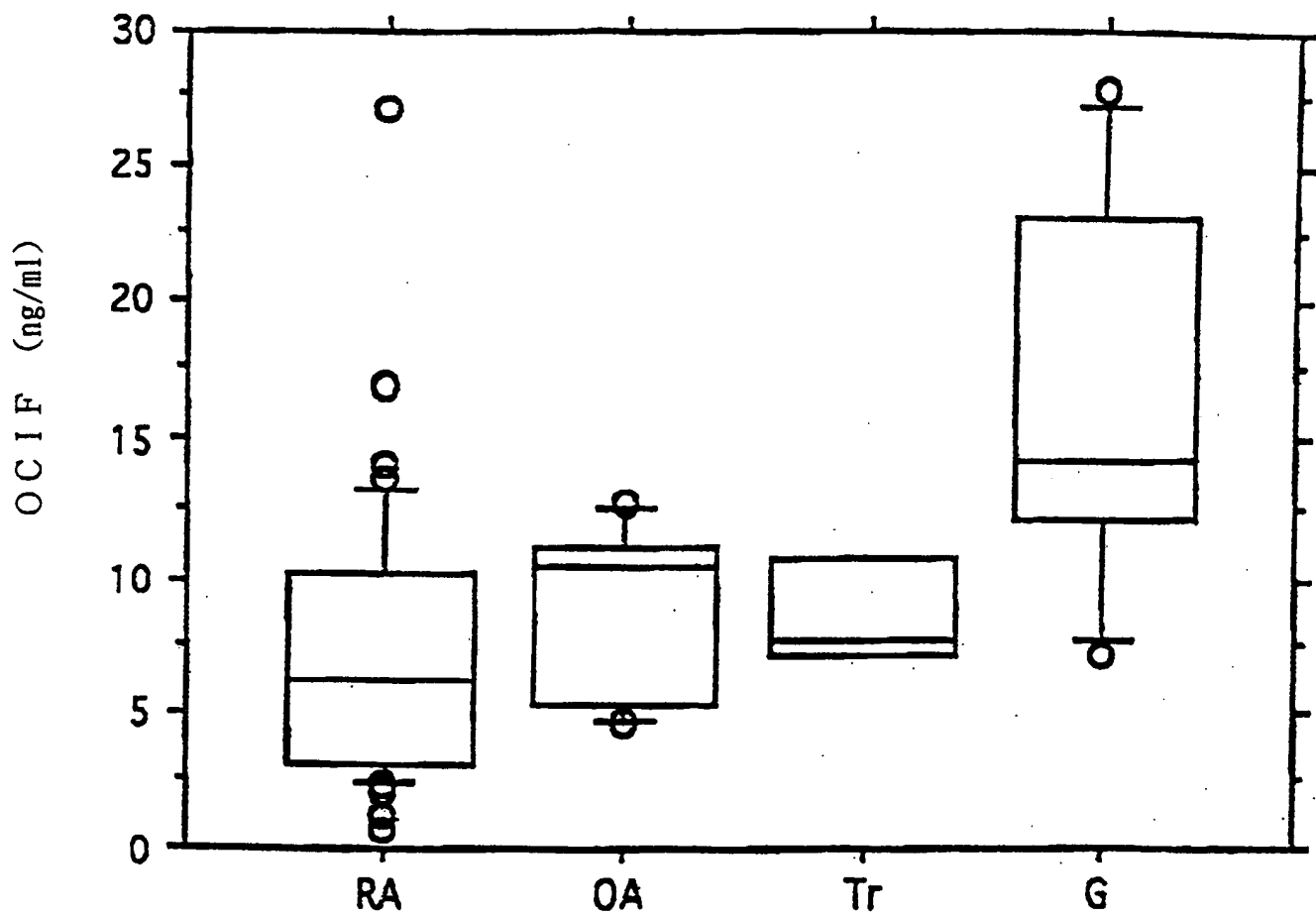
5 / 6

第5図



6 / 6

第6図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12P21/08, G01N33/53, C07K16/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12P21/08, G01N33/53, C07K16/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Medline

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | WO, 96/26217, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 29 August, 1996 (29. 08. 96) & JP, 8-525553, A & EP, 816380, A | 1-9 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 August, 1998 (28. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
8 September, 1998 (08. 09. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12P21/08, G01N33/53, C07K16/24

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12P21/08, G01N33/53, C07K16/24

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Medline

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | W0, 96/26217, A (雪印乳業株式会社) 29. 8月. 1996 (29, 08, 96) & JP, 8-525 553, A&EP, 816380, A | 1 - 9 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 08. 98

国際調査報告の発送日

08.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平 田 和 男



4B-7823

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.